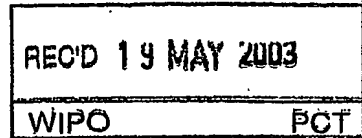


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

102 36 925.9

BEST AVAILABLE

Anmeldetag:

12. August 2002

Anmelder/Inhaber:

MICRONAS GmbH, Freiburg im Breisgau/DE;
Micronas Holding GmbH, Freiburg im Breisgau/DE;
Dr. Holger K l a p p r o t h , Freiburg im Breisgau/DE.

Bezeichnung:

Verfahren zum Immobilisieren von Molekülen auf
Oberflächen

Priorität:

12.4.2002 DE 102 16 446.0

IPC:

B 01 D, G 01 N, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 16. April 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Agurks

Beschreibung

Verfahren zum Immobilisieren von Molekülen auf Oberflächen

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Immobilisieren von Verbindungen, insbesondere von Molekülen, wie beispielsweise Biomolekülen, auf Oberflächen oder festen Trägern.

10 Chip-Verpackungstechniken, bei denen mehrere ICs (integrated circuit) in einem Gehäuse untergebracht werden sind im Stand der Technik bekannt. Dabei werden z.B. beim stacked-die-Aufbau häufig Zwischenschichten aus Polymeren verwendet, welche die Verbindung der übereinander gestapelten ICs herstellen und gleichzeitig die unter Umständen empfindliche Ober-
15 seite des unteren Chips mechanisch schützen helfen. Die Herstellung solcher Schichten ist in einigen Fabriken Teil des Serien-Herstellungsprozesses und insbesondere können die Dicken solcher Schichten im Bereich weniger μm und sogar darunter
20 genau eingestellt werden.

Für viele biochemische und biotechnologische Applikationen ist es sinnvoll, Biomoleküle an feste Träger zu immobilisieren. Zur Biokonjugation an anorganische Substrate werden üblicherweise Cross-Linker verwendet, die die Verbindung zwischen der anorganischen Schicht und den Biomolekülen herstellen. Beispielsweise wird in der EP 1132739 B1 ein Verfahren offenbart, welches dazu dient, bei der Biokonjugation Moleküle an anorganische Substrate über Cross-Linker zu binden, wobei
30 bei solche Cross-Linker beispielsweise Silane sein können. Es wird in der EP 1132739 B1 weiterhin ein Linker-System vorgeschlagen, welches zum Nachweis und zur Isolierung von Biomolekülen und als Bestandteil eines Sensor- oder Biochips bzw. als diagnostisches Instrument eingesetzt werden kann. Beispielsweise kann so in biochemischen Prozessabläufen ein immobilisiertes Enzym mehrfach verwendet werden. Fernerhin ist
35 die Immobilisierung von Enzymen und anderen Biomolekülen eine

Schlüsseltechnologie in der Entwicklung von bio-kompatiblen Implantaten.

Es sind insgesamt mehrere Verfahren bekannt, Moleküle - beispielsweise Biomoleküle - an Oberflächen von Trägern zu binden. Im Bereich der Immunologie werden beispielsweise Polystyrenoberflächen wie PolySorp und MaxiSorp eingesetzt, um Biomoleküle an Oberflächen zu binden oder zu konjugieren.

10 Aus der EP 0646 038 ist bekannt, passivierte und stabilisierte, poröse Träger herzustellen und zur Biokonjugation zu verwenden. Diese Träger weisen ein umkehrbares hohes Sorptionsvermögen auf, das im wesentlichen nicht einhergeht mit einer nicht-spezifischen Adsorption von Molekülen wie z.B. Proteinen, Polysacchariden oder Oligo- oder Polynukleotiden.

Ein Verfahren zum Anbringen von Biomolekülen an Oberflächen mittels Linker-ähnlicher Gruppen wird in der DE 100 04 884 beschrieben. Das Verfahren beinhaltet ein in Kontakt bringen des die Linker-ähnlichen Gruppen aufweisenden Polymers mit einer Quelle für Hydroxidionen, wodurch Biomoleküle, wie z.B. Heparin, auf Substratoberflächen aufgebracht werden können.

Für den Fachmann sind in dem Zusammenhang der Biokonjugation zwei wesentliche Fragestellungen relevant:

- (i) wie viele Moleküle binden insgesamt auf einer definierten Oberfläche und
- (ii) wie viele Moleküle weisen nach dem Prozess der Bindung noch eine Aktivität auf.

Nachteilig bei den bekannten Verfahren zur Biokonjugation ist, dass Linker eingesetzt werden, um die Moleküle an die Träger zu binden. Die Anwesenheit der Linker setzt die Aktivität der gebundenen Moleküle nachteilig herab. Die bekannten Verfahren sind weiterhin zeitaufwendig und durch den Einsatz der Linker oder der entsprechenden Analoga teuer.

Das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende technische Problem besteht darin, ein Verfahren bereitzustellen, das eine einfache und kostengünstige Konjugation oder Immobilisierung von Biomolekülen an einer Oberfläche ermöglicht und bei dem die Aktivität der gebundenen Moleküle weitestgehend erhalten bleibt.

10 Dieses Ziel wird durch ein Verfahren gemäß der Merkmale des Anspruchs 1 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung sind Gegenstand der Unteransprüche.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Immobilisieren von Molekülen auf Oberflächen, ist vorgesehen, eine Schicht eines hydrophoben und insbesondere nicht quellbaren Polymers auf die Oberfläche aufzubringen und Moleküle auf einer Oberfläche der Polymerschicht zu immobilisieren.

20 Derartige hydrophobe Polymere sind beispielsweise Polyimid oder Polystyrol. Die Oberfläche, auf welche die Polymerschicht aufgebracht ist, besteht vorzugsweise aus einem anorganischen Material, wie beispielsweise einem Halbleitermaterial, insbesondere Silizium, einem Halbleiteroxid, insbesondere Siliziumdioxid, Glas, Nitrid oder Keramik.

Hydrophobe Polymere, wie Polyimid oder Polystyrol, besitzen den Vorteil, dass sie mittels herkömmlicher, in der Halbleitertechnologie bekannter Verfahren auf die Oberfläche eines anorganischen Trägers aufgebracht werden können. Darüber hinaus isolieren sie den Träger elektrisch gegenüber den auf die Oberfläche der Polymerschicht aufgebrachten Molekülen oder in Zusammenhang mit diesen Molekülen stehenden Substanzen. In den beispielsweise aus einem Halbleitermaterial bestehenden Träger können somit elektrische Sensoren und Auswerteschaltungen integriert werden, ohne deren Funktion durch die auf die Oberfläche der Polymerschicht aufgebrachten Moleküle und Substanzen negativ zu beeinflussen.

Die Oberfläche des Trägers kann bei dem erfindungsgemäßen Verfahren vollständig oder nur teilweise mit dem organischen hydrophoben Polymer bedeckt werden, wobei mit Hilfe eines in
5 der Halbleiterindustrie üblichen Maskenprozesses Teile der Oberfläche ausgespart werden können. Dadurch können später elektrische Anschlusskontakte (Bonds) an dem Träger, beispielsweise einem Chip, angebracht werden können. Es ist auch möglich, Teile der Oberfläche aus anderen Gründen auszusparen
10 und so Bereiche der gegebenenfalls anorganischen Oberfläche unbedeckt zu lassen, oder umgekehrt nur solche bestimmte Stellen der Oberfläche mit dem Polymer zu beschichten, an denen später Moleküle, beispielsweise Biomoleküle, haften können.

15 Für die Immobilisierung wird die Polymerschicht mit organischen Molekülen, die mit dieser eine Verbindung eingehen können, in Kontakt gebracht. Das in Kontakt bringen erfolgt so, dass die Moleküle ortsspezifisch gebunden werden.

20 Vorzugsweise sind Sensorelemente in dem Träger unterhalb der Oberfläche, auf welche die Polymerschicht aufgebracht ist, integriert, um Messungen an den auf der Oberfläche der Polymerschicht immobilisierten Molekülen vornehmen zu können. Diese Messungen können beispielsweise dazu dienen, die Eigenschaften der Biomoleküle oder chemische Reaktionen, die in deren Umgebung stattfinden, zu charakterisieren.

30 Beispielsweise können Antikörper an Oberflächen hydrophober Polymerschichten, beispielsweise aus einem Polyimid oder einem Polystyrol, mit denen als Träger dienende Halbleiterkörper oder Halbleiterschichten leicht beschichtet werden können, gut gebunden werden, so dass sich anschließend klassische Nachweisreaktionen wie z.B. ELISA Reaktionen durchführen
35 lassen.

Moleküle im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sind insbesondere Peptide, Proteine, Gene und deren Fragmente, Nukleinsäuren, Kohlenhydratstrukturen wie Zucker, Zellen und deren Fragmente, Zellmembranbestandteile und/oder Hormone.

5 Selbstverständlich können auch Mikroorganismen, Zellextrakte, Liganden, Antigene, Antikörper, Rezeptoren, Lektine, Glycopeptide und/oder Lipide als Molekül an der Oberfläche der Polymerschicht immobilisiert werden. Bei den Mikroorganismen kann es sich um lebende oder tote Mikroorganismen handeln, 10 wobei die lebenden Mikroorganismen im Sinne der Erfindung sowohl wachsende als auch ruhende Zellen betreffen. Die Mikroorganismen können durch intrazelluläre Vernetzung der Zellen auf dem Träger preimmobilisiert werden, wobei unter Preimmobilisierung alle Verfahren verstanden werden, die vor dem Im- 15 mobilisieren gemäß des erfindungsgemäßen Verfahrens zu einer Fixierung der Moleküle oder Zellen führen können. Bei dem Einschluss in eine Polymermatrix zur Preimmobilisierung der Mikroorganismen werden zweckmäßigerweise Biopolymere verwendet, wie beispielsweise Polysaccharide oder Proteine oder a- 20 ber synthetische Polymere.

Weiterhin ist es selbstverständlich möglich, auch Liganden als Moleküle auf der Oberfläche der Polymereschicht zu immobilisieren. Liganden im Sinne der Erfindung sind z.B. Moleküle, wie zum Beispiel Proteine oder Ionen, die um eine Zentralstruktur gruppiert sein können. Liganden können ein und mehrzählig sein. Unter Liganden können jedoch auch Moleküle verstanden werden, die an spezifische Stellen von Makromolekülen gebunden werden, beispielsweise Substrate oder Coenzyme 30 an ein Protein. Im Sinne der Erfindung sind unter Molekülen oder Biomolekülen auch Antigene und/oder Antikörper zu verstehen. Antigene im Sinne der Erfindung sind alle Substanzen, die eine Immunantwort auslösen können. Es kann sich um körperfremde, natürliche oder synthetische Makromoleküle, insbesondere Proteine oder Polysaccharide, mit einem Molekulargewicht von über 2 Kilo-Dalton handeln sowie um Oberflächenstrukturen von Fremdpartikeln. Ein Antigen gemäß der Erfin- 35

5 dung kann aus einem hochmolekularen Teil bestehen, der als Substrat von meist mehreren niedermolekularen Gruppen dient, die für die Spezifität der Immunantwort und die Reaktion der Antigene mit den entsprechenden Immunoglobulinen ausschlaggebend sind. Die Antigene können polyvalent und monovalent sein und so mit einer bzw. mit mehreren Antikörperarten wechselwirken.

10 Es kann auch vorgesehen sein, statt der Antigene Antikörper auf dem Träger zu immobilisieren. Unter Antikörpern werden insbesondere Glycoproteine verstanden, die spezifisch mit einem Antigen wechselwirken. Durch die Wechselwirkung kommt es zur Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Die Antikörper können beispielsweise verschiedene Gruppen der Immunglobuline
15 sein. Die Antikörper können als intakte Antikörper oder als verschiedene Fragmente, die beispielsweise mittels Spaltung von verschiedenen Peptidasen erzeugt werden können, immobilisiert werden. Die Antikörper können vor oder während bzw. nach der Immobilisierung auf dem Träger modifiziert werden,
20 zum Beispiel durch Reduktion, Oxidation oder durch eine Oligomerisation. Weiterhin ist es möglich, als Biomoleküle auch Rezeptoren einzusetzen. Rezeptoren sind beispielsweise Proteine, die mit einem extrazellulären Signalmolekül, beispielsweise einem Ligand, in Wechselwirkung treten und durch Konformationsänderungen bestimmte Funktionen, insbesondere über sekundäre Botenstoffe, aktivieren oder initiieren. Rezeptoren im Sinne der Erfindung können jedoch auch spezielle Zellen sein, die Reize aufnehmen und die entsprechende Informationen weiterleiten; Beispiele hierfür wären Foto-, Chemo-, Thermo-
30 und Barorezeptoren.

35 Vorzugsweise ist die Oberfläche, auf welche die Polymer-schicht aufgebracht wird, weitgehend planar, d.h., es handelt sich um eine Oberfläche mit geringer Rauigkeit wie z.B. Oberflächen von Halbleiterschichten oder Halbleiterkörpern mit integrierten Schaltungen (IC Oberflächen), die jedoch lo-

kale mikroskopische Strukturen, die z.B. zur Aufnahme von Biomolekülen geeignet wären, aufweisen können.

Unter Immobilisierung oder Preimmobilisierung im Sinne der
5 Erfindung sind alle Methoden zur Einschränkung der Beweglichkeit und Löslichkeit von Molekülen auf chemischen, biologischen und/oder physikalischen Wegen zu verstehen, wobei die Preimmobilisierung alle Verfahren zur Fixierung der Moleküle betrifft, die vor der Immobilisierung gemäß des erfindungsge-
10 mäßigen Verfahrens durchgeführt werden. Die Immobilisierung und/oder Preimmobilisierung kann durch unterschiedliche Methoden erfolgen, wie der Bindung der Moleküle untereinander oder an Träger, durch Festhalten im Netzwerk einer polymeren Matrix oder Umschließen durch Membranen. Durch die Immobilisierung werden die Moleküle nicht nur wiederverwendbar, sondern können nach dem Prozess der Interaktion mit der Probe leicht wieder abgetrennt werden. Sie lassen sich in sehr viel höheren lokalen Konzentrationen und in kontinuierlichen Durchflusssystemen einsetzen. Die Bindung bzw. die Immobilisierung der Moleküle an den Träger kann durch direkte Träger-
15 verbindung und durch Quervernetzung erfolgen. Die Trägerbindung erfolgt gemäß der Erfindung insbesondere durch ionische, adsorptive oder durch kovalente Bindung. Die Quervernetzung im Sinne der Erfindung ist eine Vernetzung der Moleküle untereinander oder mit anderen Polymeren. Bei der Immobilisierung durch Einschluss werden die Moleküle in Gelstrukturen bzw. in Membranen eingeschlossen, bevor sie auf der Oberfläche des Trägers immobilisiert werden.
20

30 Dem Fachmann sind zahlreiche Möglichkeiten bekannt, die Moleküle auf dem Träger zu immobilisieren. Die Immobilisierung sollte hierbei so erfolgen, dass jeder Sonde bzw. Molekül eine definierte Position auf dem Träger zugeordnet werden kann und dass jede Position auf dem Träger unabhängig ausgewertet
35 werden kann. Es kann aber auch gewünscht sein, dass sich die Auftragungsorte verschiedener Moleküle oder Sonden teilweise oder vollständig überlappen oder dass Biomolekülgemische auf-

getragen werden. Die Immobilisierung kann beispielsweise mit einem an die Halbleitertechnik angelehnten Verfahren erfolgen. Im wesentlichen können die Moleküle oder Biomoleküle auf zwei prinzipiell verschiedenen Wegen auf dem Träger immobilisiert werden: (a) zum einen ist die In situ-Synthese der Moleküle an definierten Positionen auf dem Träger durch sukzessive Kopplung monomerer Synthesebausteine möglich, (b) zum anderen ist ein Ablegen und Immobilisieren von zuvor synthetisierten oder aus Bibliotheken stammenden Biomoleküle oder anderer Moleküle an definierten Positionen des insbesondere funktionalisierten Trägermaterials möglich. Hierfür können sowohl Spotting als auch Druckverfahren eingesetzt werden. Unter Spotting versteht man Verfahren, bei denen Flüssigkeitstropfen, in denen die Moleküle befindlich sind, auf dem Träger abgelegt werden, wobei durch Oberflächenwechselwirkung und Trocknung im wesentlichen runde Spots entstehen. Aber auch andere Druckverfahren ermöglichen es, die Moleküle in definierten Flächen auf der Oberfläche des Trägers abzulegen, wodurch eine stabile Bindung der Proben an die Substratoberfläche der Moleküle mit hoher Kopplungseffizienz erfolgen kann. Alle dem Fachmann bekannten Immobilisierungsmaßnahmen von Biomolekülen an z.B. Säulenmaterialien können ebenfalls verwandt werden, um die Moleküle auf dem Träger zu immobilisieren.

Ausgewählte Verfahren zum Immobilisieren oder Preimmobilisieren sind beispielsweise das Contact Tip Printing, Ring and Pin Printing, Nanoelectric Printing and Nanopipetting, Bubble Jet Printing, TopSpot Printing, Micro Contact Printing, Micro Fluidic Networks-Methoden, Photolithographic Activation-Verfahren, Photoresist Lithography, Electrochemical Focusing und Micro Wet Printing. Erfindungsgemäß können alle diese Verfahren angewendet werden.

In Sinne der Erfindung können als Träger anorganische Oberflächen umfassend Metall, Polypropylen, Teflon, Polyethylen, Polyester, Polystyren, Nitrid, Keramik und/oder Glas einge-

setzt werden, beziehungsweise IC (integrated circuit) Oberflächen, Silizium, Siliziumdioxid oder andere. Metalle im Sinne der Erfindung sind alle Verbindungen, deren Zusammenhalt durch ein Kristallgitter entsteht. Die Grenze zwischen

5 Metallen und Nichtmetallen ist fließend, so dass auch die Elemente Ce, Sn, As und Sb im Sinne der Erfindung Metalle sind. Zu den Metallen gemäß der Erfindung gehören auch die metallischen Gläser, das heißt Werkstoffe, die sich in einem metastabilen, weitgehend amorphen Zustand befinden. Selbst-

10 verständlich sind auch metallisch leitfähige Polymere Metalle im Sinne der Erfindung. Vorteilhafterweise weisen Metalle im Sinne der Erfindung insbesondere eine gute Festigkeit, eine gute Härte und Verschleißbeständigkeit, eine hohe Zähigkeit und eine gute elektrische und thermische Leitfähigkeit auf.

15 Polypropylene im Sinne der Erfindung sind thermoplastische Polymere des Propylens. Polypropylene zeichnen sich insbesondere durch eine hohe Härte, Rückstellfähigkeit, Steifheit und Wärmebeständigkeit aus. Teflon gemäß der Erfindung sind Polytetrafluoroethylene, die vorteilhafterweise gute thermoplastische Eigenschaften aufweisen. Polyethylene entstehen insbesondere durch eine Polymerisation von Ethylen nach im wesentlichen zwei unterschiedlichen Methoden, dem Hochdruck- und dem Niederdruckverfahren. Polyethylene, die im Hochdruckverfahren hergestellt werden, weisen vorteilhafterweise eine geringe Dichte auf. Die Eigenschaften von Trägern, die Polypropylen umfassen, werden im wesentlichen durch den Charakter des Polyethylen als partiell kristallinem Kohlenwasserstoff bestimmt. Vorteilhafterweise sind Polyethylene bis zu

20 60° Grad in allen üblichen Lösungsmitteln praktisch unlöslich. Vorteilhafterweise bewirken polare Flüssigkeiten wie Alkohol, Ester und Ketone bei Zimmertemperatur kaum eine Quellung von Polyethylenen und somit der Trägerbeschichtung. Gegen Wasser, Laugen und Salzlösungen sowie anorganischen Säuren verhalten sich Polyethylene vorteilhafterweise völlig

30 indifferent. Träger, die Polyethylene umfassen, haben z.B. eine sehr geringe Wasserdampfdurchlässigkeit. Der Träger kann jedoch zweckmäßigerweise auch Polyester umfassen. Polyester

35

im Sinne der Erfindung sind Verbindungen, die durch Ringöff-
nungspolymerisation von Lactonen oder durch Polykondensation
von Hydroxycarbonsäuren bzw. von Diolen und Dicarbonsäuren
bzw. Dicarbonsäurederivaten hergestellt werden. Polyester im
5 Sinne der Erfindung umfassen auch Polyesterharze, Polyesteri-
mide, Polyesterkautschuke, Polyesterpolyole und Polyesterpo-
lyuretane. Polyester sind vorteilhafter Weise Thermoplaste
und besitzen ausgesprochenen Werkstoffcharakter. Sie zeichnen
sich beispielsweise durch eine hohe Thermostabilität aus und
10 können zu Legierungen mit Metallen, wie beispielsweise Kup-
fer, Aluminium und Magnesium, verarbeitet werden.

Es kann jedoch auch vorgesehen sein, dass der Träger Keramik
umfasst. Keramik im Sinne der Erfindung ist eine Sammelbe-
15 zeichnung für insbesondere anorganische und überwiegend
nicht-metallische Verbindungen, die zu mehr als 30 Vol.% kri-
stalline Materialien umfassen. Dem Fachmann sind verschiedene
Keramiken bzw. keramische Werkstoffe bekannt, die er als Trä-
ger einsetzen kann. Es kann sich beispielsweise um sogenann-
20 tes Steingutgeschirr, Spaltplatten, Laborporzellan, Alumini-
umoxidkeramik, Dauermagnetwerkstoffe, Silicasteine und Magne-
siasteine handeln. Bei tonkeramischen Werkstoffen wird im
Sinne der Erfindung in grobe und feine Werkstoffe unterschie-
den, wobei feine tonkeramische Werkstoffe Irdengut, Steingut,
Steinzeug und Porzellan umfassen. Es können jedoch mit Vor-
teil auch sonderkeramische Werkstoffe wie Glas-, Oxidkeramik,
SiC-Steine und schmelzflüssig gegossene Steine als Träger
eingesetzt werden. Bevorzugt kann der Träger auch Glas umfas-
sen. Glas im Sinne der Erfindung sind Stoffe, im amorphen,
30 nichtkristallinen Festzustand, das heißt, der Glaszustand
lässt sich im Sinne der Erfindung als eingefrorene unterkühl-
te Flüssigkeit bzw. Schmelze auffassen. Gläser sind daher an-
organische oder organische, meist oxidische Schmelzprodukte,
die durch einen Einführvorgang ohne Auskristallisation der
35 Schmelzphasenkomponenten in einen festen Zustand überführt
wurden. Selbstverständlich sind im Sinne der Erfindung auch
Kristalle, Schmelzen und unterkühlte Schmelzen als Gläser

aufzufassen. Die Gläser können zum Beispiel Flachglas, Labor-
geräteglas, Bleikristallglas, Faserglas, optische Glasfasern
und andere sein. Selbstverständlich ist es auch möglich, dass
Silicat-freie Gläser beispielsweise Phosphatgläser eingesetzt
5 werden. Der Träger kann jedoch auch so beschaffen sein, dass
optische Gläser, das heißt, z.B. Gläser mit besonderen opti-
schen Brechungsindexen, eingesetzt werden.

Es ist im Sinne der Erfindung selbstverständlich, dass die
10 Oberfläche der Träger modifiziert werden kann. Die Modifizie-
rung der Träger kann insbesondere durch Einwirken von biolo-
gischen, physikalischen und/oder chemischen Einflüssen erfol-
gen. Physikalisches Einwirken wäre beispielsweise das Polie-
ren, Ätzen, Beizen, Sandstrahlen, aber auch physikalische
15 Verfahren, die zu einem Härten, Beschichten, Vergüten, Über-
ziehen mit Schutzhäuten und ähnlichem führen. Eine Oberflä-
chenbehandlung durch biologische Einwirkung kann beispiels-
weise das Bewachsen durch Mikroorganismen umfassen. Eine che-
mische Modifikation der Oberfläche der Träger beinhaltet bei-
20 spielsweise die Behandlung mit Säuren, Basen, Metalloxiden
und anderem. Die Oberfläche der Träger kann so modifiziert
werden, dass die Moleküle auf dem Träger besonders gut haften
bzw. so haften, dass sie in ihrer Aktivität nicht nachteilig
modifiziert werden. Die Oberflächenmodifizierung umfasst auch
das Beschichten mit Poly-L-Lysinen, Aminosilanen, Aldehydsi-
lanen, Epoxy-Gruppen, Gold, Streptavidin, reaktive Gruppen,
Polyacrylamid-Pads, immobilisierte Nitrocellulose und/oder
aktivierten Aldehyden bzw. Agarose-Aldehyd-Gruppen, wodurch
insbesondere gebunden werden: DNA, COO^- -Gruppen, NH_2 -Gruppen,
30 Biotin, Thiol-Gruppen und andere. Eine Oberflächenmodifizie-
rung der Träger umfasst selbstverständlich auch eine Behand-
lung, die zu einer erhöhten Stabilität und Bruchfestigkeit
führt. Es können selbstverständlich, insbesondere beim Immo-
bilisieren von Biomolekülen, auch klassische Oberflächenmodi-
35 fizierungen aus der Histologie vorgenommen werden.

Bei einer Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen in bestimmten Abschnitten der Oberfläche der Polymerschicht weitere Halbleiterkörper oder Halbleiterschichten mit integrierten Schaltungen oder zusätzliche Mikrosysteme aufzubringen. Als
5 Polymerschicht eignet sich hierbei insbesondere ein Polyimid, das für solche Anwendungen in der Halbleitertechnologie bekannt ist. Polyimide sind insbesondere hochtemperaturbeständige Polymere; vorteilhaft weisen sie ausgezeichnete mechanische, thermische und elektrischen Eigenschaften auf. Bisher
10 bekannten Anwendungen des Polyimids in der Halbleitertechnologie umfassen insbesondere Pufferschichten, Passivierungsschichten, Bindschichten und dielektrische Zwischenschichten auf dem Träger. Polyimide werden insbesondere flüssig aufgebracht und dann ausgehärtet. Bei diesem Aushärtungsschritt
15 erhält das Polyimid mit Vorteil die gewünschten Eigenschaften. Für die Anwendungen kann das Polyimid lithographisch strukturiert werden. Polyimid kann selbstverständlich auch als Haftungsvermittler für Vergussmaterial und als Pufferschicht eingesetzt werden. Die Polyimidschicht reduziert beispielsweise den Stress im Silizium, der durch die Kapselung hervorgerufen wird und verhindert Risse an den Kanten. Das
20 Polyimid muss insbesondere unter sehr gleichmäßigen Temperaturbedingungen gehärtet werden um Rissbildung im Polyimid und Farbungleichmäßigkeiten zu verhindern. Niedrige Sauerstoffwerte sind z.B. vorteilhaft, um eine gute Haftung zu erreichen.

Das ebenfalls als Polymerschicht zur Immobilisierung von Molekülen gemäß der Erfindung verwendbare Polystyrol ist ein thermoplastischer Kunststoff, der vor allem durch radikalische Polymerisation von Styrol gewonnen wird. Das radikalische Ende einer wachsenden Polymerkette greift nie eine Doppelbindung im Ring an, da der Benzolring eine außerordentlich stabile Struktur ist. Hieraus leiten sich mehrere Vorteile bei der Verwendung von Polystyrol ab, beispielsweise ist Po-
35 lystyrol beständig gegenüber Säuren, Laugen und Alkohol.

Bei einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltungsform der Erfindung wird das hydrophobe Polymer nur in vordefinierten Bereichen auf die Oberfläche aufgetragen.

- 5 Bei einer weiteren besonders bevorzugten Ausgestaltungsform wird die Oberfläche durch Plasmabehandlung positiv und/oder negativ elektrisch geladen, d.h., die Oberflächen sind an den unterschiedlichsten Stellen unterschiedlich geladen. Polymere Werkstoffe liegen insbesondere in verschiedenen Formen vor.
- 10 Die einzelnen Formen stellen unterschiedliche Anforderungen an den Bearbeitungsprozess. Je nach Ausformung der Oberfläche ist diese z.B. den Plasmen in unterschiedlicher Weise zugänglich. Eine Plasmabehandlung der Polymeroberfläche kann vorteilhafter weise die Oberflächenenergie stark erhöhen und an-
- 15 dere Verarbeitungsverfahren ermöglichen. Bei einer Plasmabehandlung reagieren vor allem die Ionen und Radikale des Plasmas mit der Polymeroberfläche und erzeugen dort funktionale Gruppen, welche die Oberflächeneigenschaften des Polymers mit Vorteil bestimmen. Durch die positive oder negative Ladung
- 20 wird insbesondere eine bessere Benetzbarkeit und/oder eine bessere Bindung der Biomoleküle erreicht.

- In einer weiteren bevorzugten Ausgestaltungsform der Erfindung werden UV reaktive Moleküle durch die Bestrahlung mit UV Licht kovalent immobilisiert. Beispielsweise kann es vorgesehen sein, photolabile Schutzgruppen auf Glas durch Licht, das selektiv durch eine photolithografische Maske strahlt, ortsgelungen für die Oligosynthese zu aktivieren. Das Glas wird dann mit photolabilen Molekülen, beispielsweise DNA-Basen,
- 30 geflutet, die an die definierten vorher beleuchteten Arraystellen binden. Für die nächsten Oligo-Basen in den Sequenzen werden dann entsprechend andere photolithographische Masken benutzt und der Vorgang wiederholt. Für Jede Base im Proben-Oligo (pro Position) werden also 4 Masken benötigt. Mit Vor-
- 35 teile kann so Herstellung direkt aus bekannten Sequenzdatenbanken erfolgen, wobei eine einheitliche Normierung erreicht wird.

Werden hydrophobe Moleküle, insbesondere Biomoleküle mittels
5 eines der oben genannten Verfahren, beispielsweise einem
Druckverfahren, auf die Oberfläche der hydrophoben Polymer-
schicht aufgebracht, so haften diese Moleküle aufgrund einer
hinlänglich bekannten Wechselwirkung an dieser Oberfläche an.

10 Zur Immobilisierung von Molekülen an der Oberfläche der Poly-
merschicht ist bei einer Ausführungsform des erfindungsgemä-
ßen Verfahrens vorgesehen, die Oberfläche der Polymerschicht
wenigstens abschnittsweise, beispielsweise unter Verwendung
einer herkömmlichen Maskentechnik, in einem Sauerstoffplasma
15 zu aktivieren. Dadurch werden an der Oberfläche der Polymer-
schicht Aldehydgruppen, Carboxygruppen oder Hydroxidgruppen
gebildet. Diese Gruppen sind hydrophil und ermöglichen kova-
lente Bindungen mit Biomolekülen, die auf diese aktivierten
Bereiche, beispielsweise durch Bedrucken mit einer die Mole-
küle enthaltenden Lösung, aufgebracht werden. Diese kovalen-
20 ten Bindungen sind so stabil, dass die Polymerschicht mit den
darauf immobilisierten Molekülen anschließend in Seife ge-
kocht werden kann, ohne die Bindungen zu zerstören.

Vorzugsweise wird die Oberfläche nur inselhaft durch Sau-
erstoffplasmabehandlung aktiviert, wobei die die „Insel“ um-
gebenden hydrophob gebliebenen Bereiche der Polymerschicht
ein Verlaufen der aufgetragenen Lösung auf der Oberfläche be-
grenzen.

30 Im Folgenden soll die Erfindung an Hand von Ausführungsbei-
spielen näher beschrieben werden, ohne auf diese Beispiele
beschränkt zu sein.

Beispiel 1

35

Silizium-Sensorchips mit CMOS Photodioden werden mit Polysty-
rol im Spincoater mit einer Schicht von ca. 100 bis 200 nm

Polystyrol überzogen. Dazu werden die Chips mit 200 μ l einer 0, 1 % (w/v) Polystyrol-Lösung in Toluol für eine Minute bei 3000 rpm im Spincoater beschichtet. Anschließend werden die Sensorbereiche (Photodioden) mit einer Proteinlösung in einer rasterartigen Anordnung bedruckt. Es werden Antikörper in PBS-Puffer verwendet. Die Antikörper werden jeweils in einer Konzentration von 5 μ g/ml eingesetzt. Ein Teil des Rasters wird mit Antikörpern bedruckt, die mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind. Die Antikörper werden in einer feuchten Kammer bei 4°C über Nacht inkubiert und die nicht gebundenen anschließend mit PBS Puffer abgespült. Nach dem Waschen mit Aqua dest. wird der Erfolg der Immobilisierung mit Hilfe eines Fluoreszenzmessgerätes überprüft. Die erfolgreiche Bindung der Antikörper an die Sensorbereiche wird durch die Fluoreszenz der Antikörper nachgewiesen. Anschließend wird der Chip durch Aufbringen einer Reaktionskammer aus PMMA versiegelt. Die Aufbringung der Reaktionskammer erfolgt durch Verbindung des PMMA an die Polystyrolschicht. Der fertige Aufbau wird noch durch die Verwendung eines kommerziellen erhältlichen Stabilisierungsreagenz für Proteine stabilisiert und ist einsatzfertig.

Beispiel 2

Slizium-Sensorchips mit CMOS Photodioden werden bereits auf dem Waver mit einer 5 μ m Schicht Polyimid beschichtet. Anschließend wird das Polyimid mit einem Copolymer aus Benzophenonmetacrylat und Acrylsäure beschichtet. Die Träger können dann auf einfache Weise mit Biomolekülen wie DNA (5 μ M Oligonukleotid in PBS Puffer) bedruckt werden. Die Immobilisierung erfolgt durch UV-Belichten bei 300 nm für ca. 10 Minuten. Das Benzophenon des Copolymers bildet dabei Radikale, die an das Polyimidcoating sowie an die DNA eine kovalente Bindung herstellen. Der gleiche Prozess lässt sich auch mit allen anderen Biomolekülen wie Proteinen, insbesondere Antikörpern, Peptiden, Zuckern, Lipiden und Triglyceriden sowie auch komplexen Strukturen derselben durchführen.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Immobilisieren von Molekülen auf Oberflächen, das folgende Verfahrensschritte umfasst:

5

- Aufbringen einer Schicht eines hydrophoben Polymers auf die Oberfläche,

10

- Immobilisieren von Molekülen auf einer Oberfläche der Schicht.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Polymer ein Polyimid und/oder Polystyrol ist.

15

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, bei dem die Polymerschicht nur in vordefinierten Bereichen auf die Oberfläche aufgetragen wird.

20

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Oberfläche der Polymerschicht wenigstens abschnittsweise durch Plasmabehandlung positiv oder negativ elektrisch geladen wird.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem UV reaktive Moleküle durch die Bestrahlung mit UV Licht kovalent immobilisiert werden.

30

6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, bei dem die Polymerschicht wenigstens abschnittsweise in einem Sauerstoffplasma aktiviert wird.

35

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem ein Teil der Oberfläche der Polymerschicht für eine Aufbringung mit einer integrierten Schaltung (integrated circuit (IC)) oder einem Mikrosystem genutzt wird.

Zusammenfassung

Verfahren zum Immobilisieren von Molekülen auf Oberflächen

- 5 Es wird ein Verfahren zum Immobilisieren von Molekülen auf Oberflächen vorgeschlagen, wobei eine weitgehend planare Oberfläche mit einem Polymer beschichtet wird und folgend die Moleküle mittels des Polymers auf der Oberfläche immobilisiert werden.